

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Jamur *Fusarium oxysporum*

Salah satu penyakit yang menyerang tanaman tomat adalah penyakit layu yang disebabkan oleh patogen *Fusarium oxysporum*. Penyakit layu *Fusarium* ini menimbulkan kerugian 20-30% (Arsih,2015). Menurut Nurhayati (2010), Spesies *Fusarium oxysporum* menurut agrios (2005) yang didasarkan pada sistem klasifikasi konvensional ini adalah sebagai berikut Kingdom: fungi, Divisi: Ascomycota, Kelas: sordariomycetes (ascomycetes/pyrenomycetes), Bangsa: hypocreales, Famili: netriaceae, Genus: fusarium, Spesies: *fusarium oxysporum*. Jamur *Fusarium oxysporum* merupakan salah satu jenis jamur yang sangat penting untuk diketahui dalam melaksanakan budidaya tanaman. Jamur jenis ini, menjadi inang demikian banyak jenis tanaman, mulai dari tanaman yang berarti strategis sampai tanaman pagar di kebun petani. *Fusarium oxysporum* mempunyai variasi spesies yang tinggi, yaitu sekitar 100 jenis dan menyebabkan kerusakan secara luas dalam waktu singkat dengan intensitas serangan mencapai 35% (Sudantha,2010).

Jamur *Fusarium oxysporum* dalam perkembangbiakannya membentuk dua jenis spora aseksual yaitu spora mikrokonidium dan spora makrokonidium. Spora mikrokonidium bersel tunggal, tidak bersekat, tidak berwarna, berdinding tipis, bentuknya bulat telur sampai lurus dengan ukuran  $2 - 5 \times 2,3 - 3,5 \mu\text{m}$ . Pada medium Potato Dextrose Agar (PDA) mula-mula berwarna putih, semakin tua warna menjadi krem atau kuning pucat, dalam keadaan tertentu berwarna merah muda agak ungu. Miselium bersekat dan membentuk percabangan. Beberapa isolat *Fusarium* membentuk pigmen biru atau merah di dalam medium.

Di alam cendawan ini membentuk konidium pada suatu badan buah yang disebut sporodokium, yang dibentuk pada permukaan tangkai atau daun sakit pada tingkat yang telah lanjut. Konidiofor bercabang - cabang rerata mempunyai panjang 70  $\mu\text{m}$ . Cabang-cabang samping biasanya bersel satu, panjangnya sampai 14  $\mu\text{m}$ . Konidium terbentuk pada ujung cabang utama atau cabang samping. Mikrokonidium sangat banyak dihasilkan oleh cendawan pada semua kondisi, bersel satu atau bersel dua, hialin, jorong atau agak memanjang, berukuran 5-7 x 2.5-3  $\mu\text{m}$ , tidak bersekat atau kadang-kadang bersekat satu dan berbentuk bulat telur atau lurus. Makrokonidium berbentuk sabit, bertangkai kecil, kebanyakan bersel empat, hialin, berukuran 22-36 x 4-5  $\mu\text{m}$ . Klamidospora bersel satu, jorong atau bulat, berukuran 7-13 x 7-8  $\mu\text{m}$ , terbentuk di tengah hifa atau pada makrokonidium, seringkali berpasangan (Sastrahidayat, 1992).



Gambar 1: a) Mikrokonidium ; b) Makrokonidium; c) Klamidospora

(Juniawan, 2015)

*Fusarium oxysporum* merupakan jamur patogenik yang menyerang tanaman tomat dan memiliki banyak spesies *Fusarium* berada di dalam tanah berbentuk klamidospora atau sebagai hifa pada tanaman (Saragih dan

Silalahi,2006). Jamur *Fusarium oxysporum* tumbuh optimal pada suhu 25°C, dalam kondisi tersebut koloni *Fusarium oxysporum* mencapai diameter 4,5-6,5 cm. Kepadatan miselium ada yang jarang hingga banyak dan memiliki warna putih-ungu. Jamur *Fusarium oxysporum* memiliki dua fase patogenesitas dan sprogenesis. Pada fase patogenesitas, *Fusarium oxysporum* sebagai parasit pada tanaman inang. Apabila tidak ada tanaman inang maka *Fusarium oxysporum* akan hidup dalam tanah sebagai saprofit. Pada fase sprogenesis, *Fusarium oxysporum* menjadi inokulum penyebab penyakit pada tanaman lain (Djaenuddin, 2011).

Cendawan *Fusarium oxysporum* mengalami 2 fase dalam siklus hidupnya yakni patogenesa dan sprogenesis. Patogen ini hidup sebagai parasit pada tanaman inang yang masuk melalui luka pada akar dan berkembang dalam jaringan tanaman yang disebut sebagai fase patogenesa sedangkan pada fase sprogenesis merupakan fase bertahan yang diakibatkan tidak adanya inang, hidup sebagai saprofit dalam tanah dan sisa-sisa tanaman dan menjadi sumber inokulum untuk menimbulkan penyakit pada tanaman yang lain. Agrios (1997) dalam Susetyo (2010), mengemukakan bahwa patogen ini dapat menimbulkan gejala penyakit karena mampu menghasilkan enzim, toksin, polisakarida dan antibiotik dalam jaringan tanaman. Kerusakan yang ditimbulkan meliputi rebah benih, busuk akar, busuk batang dan busuk tangkai yang terjadi ketika tanaman berada pada kondisi stress atau ketika terjadi luka pada bagian luar jaringan tanaman. *Fusarium* sangat berbahaya bagi tanaman pangan karena menyebabkan kerusakan seperti kematian bibit, busuk akar dan busuk tangkai (Bacon dan Hinton, 1999 dalam Auliya', 2008). Faktor yang berpengaruh adalah cuaca lembab sehingga penyakit banyak dijumpai di kebun yang terlalu rapat, terutama pada musim hujan

karena banyak terjadi infeksi baru. Kebun yang peteduhnya ringan kurang mendapat gangguan penyakit (Semangun, 2004). Jamur *Fusarium oxysporum* juga dapat bertahan lama di dalam tanah. Tanah yang sudah terinfeksi sukar dibebaskan kembali dari jamur ini. *Fusarium oxysporum* cendawa tanah yang dapat bertahan lama dalam tanah sebagai klamidospora yang terdapat banyak dalam akar-akar yang sakit. Cendawa dapat bertahan juga pada akar bermacam-macam rumput, dan pada tanaman jenis Heliconia. *Fusarium oxysporum* menyerang melalui akar, terutama akar yang luka. Baik luka mekanis maupun luka yang disebabkan nematoda *Radophulus similis* (Semangun, 2004).

## **2.2 Ekstraksi DNA**

Analisis molekuler tumbuhan tergantung pada jumlah dan kemurnian sampel DNA (Pharmawati, 2009). Kehadiran metabolit sekunder pada tanaman terkadang menghambat proses isolasi dan menyebabkan munculnya kontaminasi pada DNA murni. DNA yang baik secara kualitas dalam arti kemurnian DNA maupun kuantitas (konsentrasi DNA) dalam proses isolasi merupakan tahap awal yang sangat penting dan harus terpenuhi dalam studi molekuler. Isolasi DNA merupakan salah satu tahap penting dalam penelitian berbasis molekuler. Hanya DNA yang berkualitas baik yang dapat digunakan untuk berbagai kegiatan molekuler, seperti analisis menggunakan marka molekuler, pustaka genom, dan sekuensing (Nugroho *et al.*, 2015).

Faktor penentu proses isolasi DNA menurut Syafaruddin dan Santoso, (2011) diantaranya adalah: penghomogenan jaringan tanaman, komposisi dalam penambahan larutan buffer serta penghilangan enzim-enzim penghambat. Dalam penelitian, proses homogenisasi tanaman dengan buffer penting diperhatikan agar

proses reaksi berjalan dengan baik. Hal tersebut dapat mempengaruhi konsentrasi dan kemurnian hasil isolasi. Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah proses pemisahan DNA dari komponen lainnya, sehingga harus bebas kontaminasi (Tenriulo, *et. al.*, 2001).

Urutan DNA memberikan data yang akurat melalui pengujian homologi yang lebih baik terhadap karakter- karakter tertentu (Baldwin et al. 1995). Selain itu, urutan DNA mengkode banyak character states yang muncul karena perbedaan laju perubahan basa-basa nukleotida (Hills dan Moritz 1996). Hasil hubungan kekerabatan yang didapat dari urutan DNA menunjukkan hasil yang lebih alami (Chase et al. 1993, Topik et al., 2005). Beberapa persyaratan yang harus dipenuhi sebelum menggunakan data sekuen DNA untuk analisis filogenetik diantaranya adalah (Hershkovitz dan Leipe, 1998): 1. Urutan DNA berasal dari sumber yang spesifik, yaitu dari inti sel (nDNA), kloroplas (cpDNA) atau mitokondria (mtDNA), 2. Urutan DNA bersifat homolog yang berarti diturunkan dari satu nenek moyang, 3. Urutan DNA mempunyai sejarah evolusi yang sama (misalnya bukan dari campuran nDNA dan mtDNA).

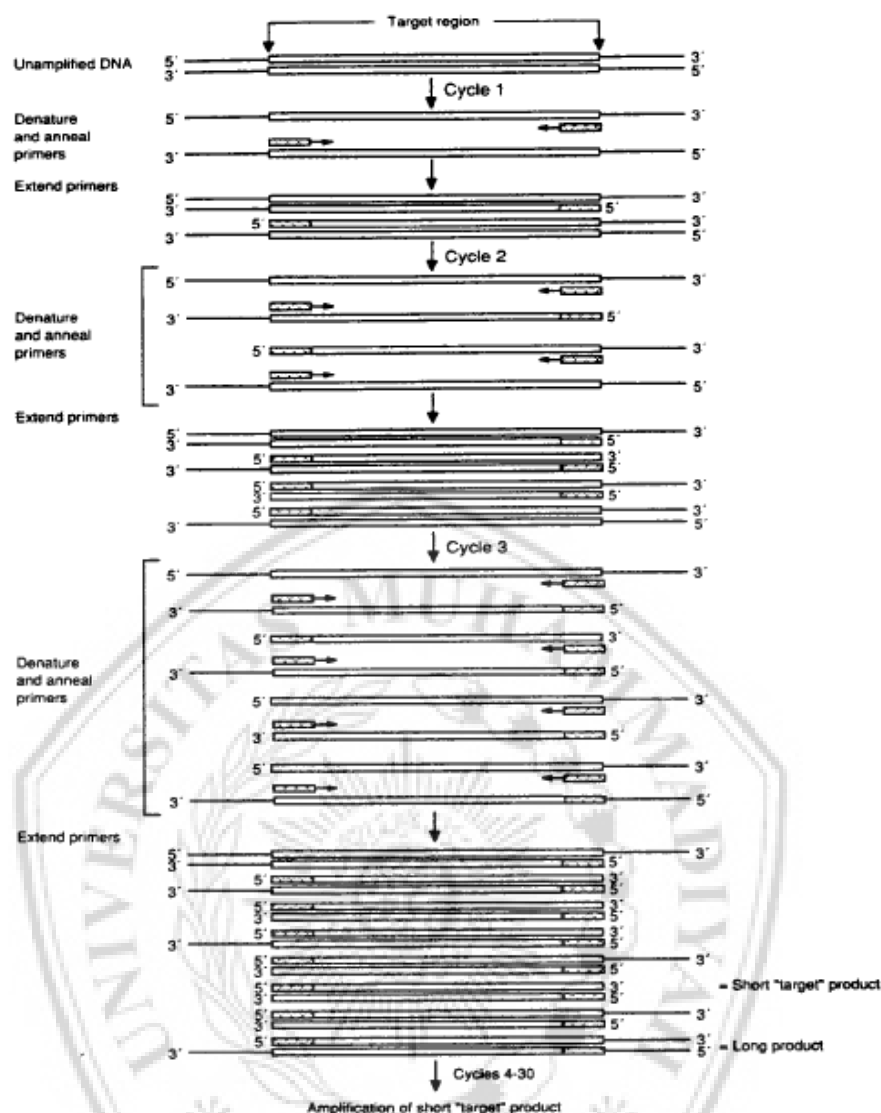
### **2.3 *Polymerase Chain Reaction (PCR)***

*Polymerase Chain Reaction (PCR)* adalah suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) DNA secara in vitro pada daerah spesifik yang dibatasi oleh sepasang primer. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA target dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. Pada dasarnya prinsip

yang terjadi dalam sintesis DNA tersebut sama dengan proses replikasi DNA terjadi di dalam sel (*in vivo*) (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Metode PCR melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah DNA; sepasang primer; marker mix PCR; dan enzim polimerase DNA (Fatchiyah, 2011). Umumnya jumlah siklus yang digunakan pada proses PCR adalah 30 siklus. Penggunaan jumlah siklus lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan jumlah amplicon secara bermakna dan memungkinkan peningkatan jumlah produk yang non-target. Perlu diingat bahwa di dalam proses PCR efisiensi amplifikasi tidak terjadi 100 %, hal ini disebabkan oleh target templat terlampaui banyak, jumlah polimerase DNA terbatas dan kemungkinan terjadinya *reannealing* untai target.

*Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah DNA template hasil isolasi dengan konsentrasi antara 0,1 ug/ul – 1 ng/ul; sepasang primer yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl<sub>2</sub>) dan enzim polimerase DNA. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu ; (1) pra-denaturasi DNA template; (2) denaturasi; (3) penempelan primer (annealing); (4) pemanjangan (extension) dan (5) pemantapan (post-extension). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), dimana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Tahap pra-denaturasi merupakan tahap yang dilakukan selama 1-9 menit di awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA polymerase.*



Gambar 2. Bagan Proses Polymerase Chain Reaction

(Sumber: Darmo Handoyo dan Ari Rudiretna 2001)

Primer berfungsi sebagai pembatas fregmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA, primer sebaiknya berukuran 18-25 basa, mengandung 50-60% basa G+C, dan memiliki  $T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) untuk kedua primer sebaiknya sama. Cara termudah menghitung untuk mendapatkan melting-temperature yang tepat menggunakan rumus  $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$ .

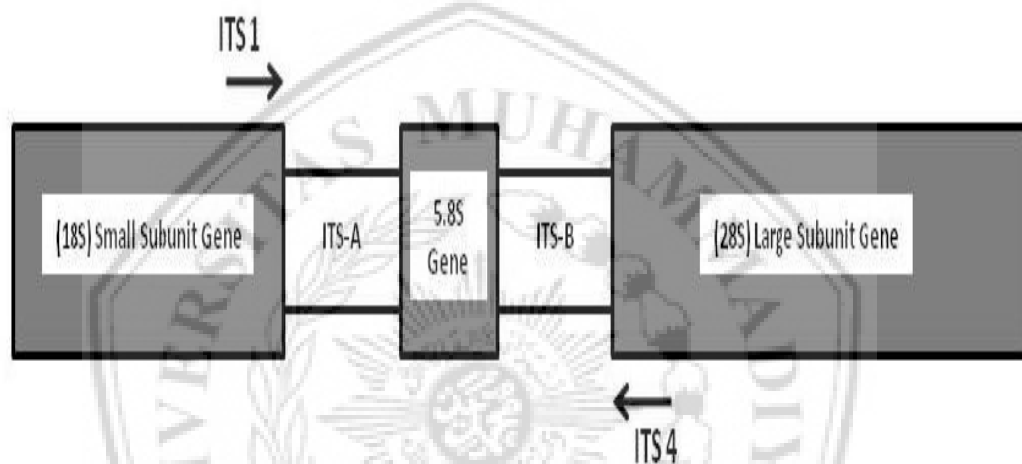
*Temperatur annealing biasanya 5°C dibawah TM primer yang sebenarnya. Semakin panjang primer, maka semakin tinggi suhu annealing.*

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat.

Primer merupakan sepotong untai DNA pendek untai tunggal. Panjangnya berkisar antar 10 sampai 40 basa. Pemilihan primer merupakan poin terpenting dalam menentukan keberhasilan dalam proses amplifikasi (PCR). Primer berfungsi untuk menginisiasi reaksi proses polimerasi DNA secara in vitro, mengenali dan menandai fragmen sampel DNA yang akan diamplifikasi. Pemilihan primer yang kurang tepat dapat mengakibatkan terjadinya kesalahan segmen yang diamplifikasi, primer akan menempel pada bagian lain dari DNA dan bukan pada bagian yang dikehendaki. Produk PCR yang dihasilkan tidak spesifik dan terbentuknya primer dimer. Output yang dihasilkan akan berupa pita tunggal dengan ukuran yang tidak sesuai seperti yang dikehendaki atau dapat juga berupa pita pita dengan ukuran yang berbeda.



Penelitian ini menargetkan sequen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) sebagai target molekuler dalam penentuan hubungan kekerabatan. Berbagai penelitian sudah sering dilakukan untuk menguji seberapa spesifik penggunaan target ini dalam mencari tahu hubungan kekerabatan pada spesies-spesies yang tergabung dalam filum *Fusarium*. Pasang primer yang digunakan pada *Fusarium* untuk wilayah ITS adalah ITS 1 dan ITS 4. (Singha, 2016)



Gambar 3. Lokasi primer ITS 1 dan 4 untuk menargetkan wilayah ITS dalam kompleks ribosomal DNA.

## 2.4 Filogenetik

Filogenetik merupakan suatu metode yang digunakan dalam analisis sistematika untuk memahami keanekaragaman makhluk hidup melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan (Hidayat dan Pancoro, 2008). Suatu kelompok organisme dalam sebuah pohon filogenetik yang anggotanya memiliki banyak kesamaan sifat atau karakter dianggap mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang. Seluruh anggota kelompok ini akan membentuk sebuah kelompok monofiletik (Gambar 2.1),

sehingga dapat diasumsikan bahwa sifat atau pola genetik dan biokimia sama (Topik, 2005). Analisis filogenetik sangat membutuhkan kelompok outgroup yang dapat menyebabkan polarisasi karakter, yaitu apomorfik dan plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah dan diturunkan yang terdapat pada ingroup. Karakter plesiomorfik merupakan karakter primitif yang terdapat pada outgroup. Karakter sinapomorfik merupakan karakter yang diturunkan yang terdapat pada kelompok monofiletik (Hidayat dan Pancoro, 2008).

Filogenetik dapat direkonstruksi dengan dua cara, yaitu berdasarkan karakter morfologi dan karakter molekular (Tjitrosoepomo, 2009). Karakter morfologi telah lama digunakan dalam banyak penelitian filogenetik. Namun hasilnya sering kali kurang akurat karena perbedaan antar spesies yang berkerabat dekat seringkali sulit diamati. Selain itu, umumnya sifat kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak gen dan sangat dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga hasilnya akan lebih akurat menggunakan penanda molekular (Maftuchah, 2001). Penelitian saat ini lebih banyak menggunakan karakter molekular seiring dengan pesatnya perkembangan teknik dalam biologi molekular seperti *polymerase chain reaction* (PCR) dan *DNA sequencing*. Filogenetik berdasarkan karakter molekular mengombinasikan antara teknik biologi molekular dengan statistik yang digunakan untuk merekonstruksi hubungan filogenetik (Hidayat dan Pancoro, 2008).

Analisis filogenetik pada umumnya melalui tiga tahap, yaitu: Alignment, rekonstruksi pohon filogenetik, dan evaluasi pohon filogenetika dengan uji statistik. Alignment digunakan untuk mengetahui keberadaan sifat homolog antar urutan DNA. Tahap ini sangat menentukan keberhasilan dari analisis

filogenetik. Hasil dari tahap alignment umumnya terdapat gap yang merupakan hasil dari adanya insersi maupun delesi karena mutasi (Mount, 2001). Rekonstruksi pohon filogenetik dapat dikelompokkan dalam dua kategori untuk mendapatkan pohon filogenetika terbaik, yaitu distance based method dan character based method. Distance based method merupakan metode yang didasarkan pada indeks p-distance (jarak perbedaan dari dua sekuen) sehingga didapat ukuran dekat/jauhnya kekerabatan antar organisme dalam pohon. Semakin besar indeks p-distance maka semakin jauh tingkat kekerabatannya. Beberapa metode yang termasuk dalam metode ini yaitu Neighbor-Joining (NJ). Character based method merupakan metode yang didasarkan pada urutan basa nukleotida atau asam amino secara langsung untuk merekonstruksi pohon. Metode yang termasuk dalam kelompok ini diantaranya adalah Maximum-Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML), dan Bayesian Inference (BI) (Lemey, 2009).